

## ВЛИЯНИЕ ВИТРИФИКАЦИИ НА ОСВОБОЖДЕНИЕ $\text{Ca}^{2+}$ ИЗ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ДЕПО ООЦИТОВ СВИНЕЙ

В.Ю. Денисенко, Т.И. Кузьмина

*ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения  
с.х. животных, Санкт-Петербург-Пушкин, Россия*

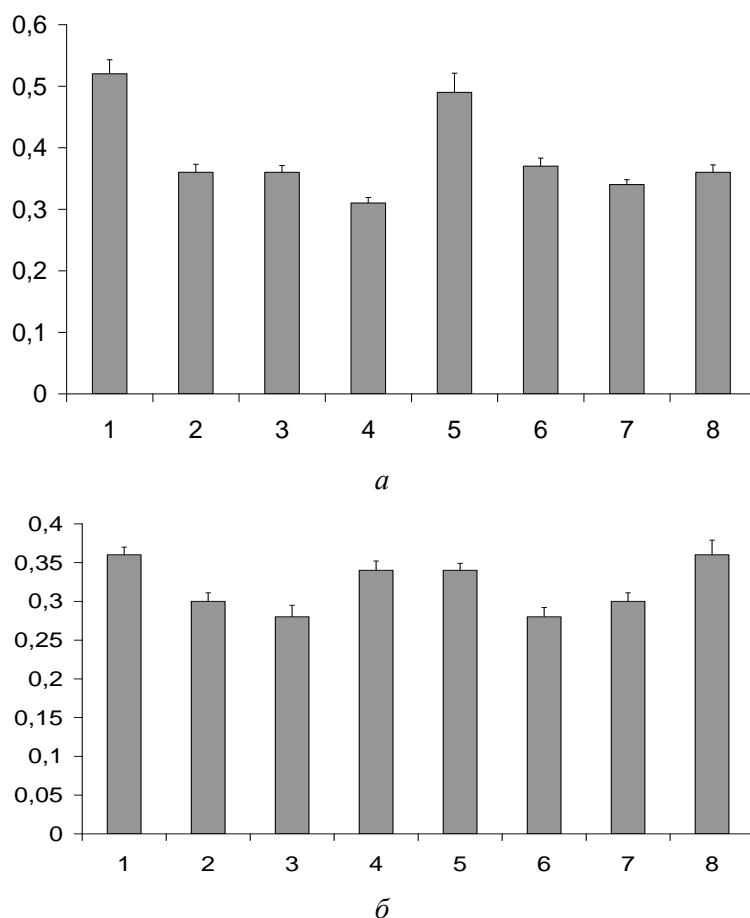
**Введение.** Интерес к криоконсервации ооцитов животных обусловлен возрастающей необходимостью совершенствования и внедрения инновационных клеточных репродуктивных технологий (получение эмбрионов *in vitro*, клонирование, трансгенез) в практику животноводства, медицину, фармакологию. В то время, как замораживание эмбрионов успешно применяется в практике, достижения в криоконсервации ооцитов незначительны. Для замороженных ооцитов характерен низкий уровень сохранности, оплодотворяемости и развития. Главные отличия криоконсервации ооцитов от эмбрионов определяются особенностями строения плазматической мембраны, наличием кортикальных гранул, строением веретена на стадии метафазы- II. Ооциты млекопитающих - один из самых «трудных» типов клеток, способных к успешной криоконсервации. Технология замораживания ооцитов, по сравнению со спермой или эмбрионами, имеет ряд технических трудностей, в связи с особенностью женских герминальных клеток, что приводит к низкой рождаемости. Относительно свежим подходом к проблеме криоконсервации без использования дорогостоящего оборудования является витрификация. Разработка эффективных методов витрификации вызывает необходимость изучения механизмов, детерминирующих криорезистентность ооцитов.

Увеличение концентрации внутриклеточного кальция в клетках происходит вследствие входа внеклеточного кальция и освобождения кальция из внутриклеточных депо [1]. Витрификация не влияет на структуру эндоплазматического ретикулума в ооцитах на стадии зародышевого пузырька - GV-стадии [2]. В то же время, в результате заморозки ооцитов нарушается способность эндоплазматического ретикулума к реорганизации в процессе созревания женских гамет, что может вызывать снижение компетентности ооцитов к развитию [3]. Также было показано, что реорганизация эндоплазматического ретикулума при созревании *in vitro*, замедлялась в ооцитах, витрифицированных до реинициации мейоза на стадии диплотены [4]. В настоящем исследовании на основе изучения флуктуации ионов кальция в донорских ооцитах свиней с использованием ингибиторного анализа характеризуются особенности деструкции цитоскелета, детерминированные витрификацией.

**Материал и методы исследований.** В экспериментах использовали яичники свиней (порода ландрас, возраст 6-8 месяцев) на стадии фолликулярного роста, без видимой патологии. Для опытов отбирали ооциты округлой формы с тонкогранулированной ооплазмой и равномерной по ширине зоной пеллюцида, выделенные из овариальных фолликулов диаметром 3-6 мм. Ооциты, предназначенные для витрификации, обрабатывали тремя растворами криопротекторов (CRA), приготовленными на среде TC-199 («Sigma») с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («Sigma»). CRA-1: 0.7 М диметилсульфоксид (ДМСО) + 0.9 М этиленгликоль (ЭГ), CRA-2: 1.4М ДМСО+1.8М ЭГ; CRA-3: 2.8 М ДМСО + 3.6 М ЭГ + 0.65 М трегалоза. Ооциты поэтапно помещали на 30 секунд в CRA-1, потом в CRA-2 и, наконец, в CRA-3 на 20 секунд. Пайеты с ооцитами опускали в жидкий азот. Витрифицированные ооциты находились в жидком азоте не

менее 1 часа. Ооциты извлекали из пайет и помещали в 3 мл 0,25 М трегалозы в среде ТС-199 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, отмывали последовательно в 0,19 М и затем в 0,125М трегалозе при 37<sup>0</sup>С, и в конце только в ТС-199. Инкубацию выделенных ооцитов проводили в модифицированной среде Дюльбеко, в отсутствии внеклеточного Ca<sup>2+</sup>. Концентрацию кальция внутриклеточных депо ооцитов свиней измеряли с помощью зонда хлортетрацилин (ХТЦ). Используемая концентрация ХТЦ составляла 40 мкМ. Интенсивность флуоресценции ХТЦ измеряли на флуориметрической установке, состоящей из люминесцентного микроскопа и фотометрической насадки. Комплекс ХТЦ-Ca<sup>2+</sup>-мембрана возбуждали светом 380-400 нм, флуоресценцию регистрировали в области 530 нм. Интенсивность флуоресценции измеряли в усл. ед. Достоверность различия сравниваемых средних значений для 4-5 независимых экспериментов оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

**Результаты исследований.** На диаграммах (рисунок 1) представлены данные, отражающие уровень содержания кальция во внутриклеточных депо интактных и витрифицированных ооцитов после воздействия теofilлина, ГДФ (гуанозиндифосфата) и ингибитора синтеза микрофиламентов - цитохалазина Д.



**Рисунок 1 – Влияние ингибитора синтеза микрофиламентов на стимулированное теofilлином и ГДФ освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо ооцитов свиней.**

По горизонтали: 1 – контрольные клетки; 2 – активация теofilлином в концентрации 10 мМ; 3 – 100 мкМ ГДФ; 4 – совместное действие теofilлина и ГДФ; 5 – действие 10 мкМ цитохалазина Д; 6 – действие цитохалазина Д с последующей обработкой теofilлином; 7 – действие цитохалазина Д с последующей обработкой ГДФ; 8 – 10 мкМ цитохалазина Д и последующее совместное действие теofilлина и ГДФ. По вертикали - интенсивность флуоресценции ХТЦ, усл. ед.; *a* - невитрифицированные ооциты, *б* - витрифицированные ооциты. Различия достоверны при: *a* - P<0.001 (1 и 2; 1 и 3), P<0.01 (2 и 4; 3 и 4; 4 и 8); *б* - P<0.001 (1 и 2; 1 и 3; 5 и 6), P<0.01 (5 и 7).

Показано, что внесение в среду инкубации теofilлина в концентрации 10 мМ или ГДФ в концентрации 100 мкМ вызывало в невитрифицированных ооцитах освобождение Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо.

точных депо. Совместное действие теofilлина и ГДФ стимулировало в ооцитах дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Обработка ооцитов ингибитором синтеза микрофиламентов цитохалазином D в концентрации 10 мкМ не оказывала влияние на уровень содержания кальция во внутриклеточных депо. Добавление цитохалазина D не влияло на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$ , активированное при использовании теofilлина или ГДФ, в то же время совместное действие теofilлина и ГДФ не приводило к дополнительному освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо в присутствии цитохалазина D.

В витрифицированных ооцитах добавление теofilлина или ГДФ также вызывало освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Однако совместное действие теofilлина и ГДФ, в отличие от действия этих соединений в невитрифицированных ооцитах, не вызывало дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Обработка витрифицированных ооцитов цитохалазином D не оказывала влияние на выход  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Обработка ингибитором синтеза микрофиламентов также не оказывала влияние на освобождение  $\text{Ca}^{2+}$ , стимулированное отдельно теofilлином или ГДФ, а также совместным действием теofilлина и ГДФ.

**Обсуждение.** Mullaney et al. принадлежит гипотеза, согласно которой ГТФ (гуанозинтрифосфат) детерминирует образование связи между различными внутриклеточными депо кальция (рианодин- и  $\text{IP}_3$ -чувствительными) и обеспечивает переход  $\text{Ca}^{2+}$  из рианодин в  $\text{IP}_3$ -чувствительные внутриклеточные депо. Совместное действие  $\text{IP}_3$  и ГТФ способствует дополнительному освобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо [5]. Ранее нами обнаружено, что при совместном действии теofilлина и ГДФ наблюдается дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо. Кроме того, как и в случае взаимодействия  $\text{IP}_3$  и ГТФ, теofilлин и ГДФ активируют освобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из разных внутриклеточных депо – теofilлин из рианодин-, а ГДФ – из  $\text{IP}_3$ -чувствительных внутриклеточных депо [6]. На основании этих данных, а также результатов, полученных с использованием тапсигаргина (неопубликованные данные), было предположено, что, возможно, как и ГТФ, ГДФ способствует образованию связи между различными внутриклеточными депо и обеспечивает переход  $\text{Ca}^{2+}$  между ними. Однако, в отличие от ГТФ, ГДФ стимулирует переход  $\text{Ca}^{2+}$  в обратном направлении – из  $\text{IP}_3$ - в рианодин-чувствительные внутриклеточные депо, откуда затем и освобождается. ГТФ образует связь с цитоскелетом, участвуя в синтезе микротрубочек [7]. Вероятно, элементы цитоскелета участвуют в образовании связи между двумя различными внутриклеточными депо кальция, способствуя обмену  $\text{Ca}^{2+}$  между ними. Как и ГТФ, ГДФ образует связь с цитоскелетом, так как на ооцитах свиньи было показано, что ингибитор синтеза микрофиламентов цитохалазин D ингибировал дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$ , стимулированное совместным действием теofilлина и ГДФ.

При исследовании криповреждений в архитектонике цитоскелета женских гамет выявлено, что витрификация оказывает различный эффект на элементы цитоскелета ооцитов. На животных различных видов было показано, что витрификация приводит к разрушению микрофиламентов и не затрагивает микротрубочки [8,9]. В наших исследованиях обнаружено, что витрификация оказывает ингибирующее влияние на дополнительное освобождение  $\text{Ca}^{2+}$ , стимулированное совместным действием теofilлина и ГДФ. Обработка витрифицированных ооцитов свиньи ингибитором синтеза микрофиламентов не приводила к изменению интенсивности флуоресценции при совместном действии теofilлина и ГДФ, что позволяет предположить, что витрификация приводит к разрушению в ооцитах микрофиламентов, при этом, не затрагивает структуры микротрубочек. Lowther et al. показали, что при криоконсервации ооцитов млекопитающих на GV-стадии сохраняются внутриклеточные мембраны, и ооциты могут завершать ядерное созревание, однако, ими же было обнаружено, что в результате витрификации может нарушаться способность эндоцитоплазматического ретикулума к реорганизации при созревании ооцитов, что обуславливает снижение их способности к развитию [2]. Полученные нами результаты подтверждают и дополняют данные Lowther et al. о деструкции микрофиламентов в замороженных ооцитах, а также свидетельствуют о приоритетной роли микротрубочек при завершении мейоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (офи-а 10-04-00389)

## Литература

1. Berridge, M.J. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms / M.J. Berridge // Biochim. Biophys. Acta. 2004. 1742: 3-7.
2. Lowther, K. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryo-preserved mouse oocytes / K. Lowther [et al.] // Biol. Reprod. 2009. 81: 147-154.
3. Kubota, C. In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation / C. Kubota [et al.] // Mol. Reprod. Dev. 1998. 51: 281-286.
4. Diez, C. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability / C. Diez [et al.] // Theriogen. 2005. 64: 317-333.
5. Mullaney, J.M. Intracellular calcium uptake activated by GTP. Evidence for a possible guanine nucleotide-induced transmembrane conveyance of intracellular calcium / J.M. Mullaney [et al.] // J. Biol. Chem. 1987. 262: 13865-13872.
6. Denisenko, V.Yu., Kuzmina, T.I. The influence of guanine nucleotides and protein kinase C on  $Ca^{2+}$  from intracellular stores of pigs oocytes stimulated by theophylline and cyclic AMP / V.Yu. Denisenko, T.I. Kuzmina // Cell and Tissue Biology. 2004. 46 (6): 557-560.
7. Hajnoczky, G. Luminal communication between intracellular calcium stores modulated by GTP and the cytoskeleton / G. Hajnoczky, C. Lin, A. Thomas // J. Biol. Chem. 1994. 269: 10280-10287.
8. Albarracin, J. L. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes / J. L. Albarracin [et al.] // Theriogen. 2005. 63: 890-901.
9. FitzHarris G. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein / G. FitzHarris, P. Marangos, J. Carroll // Dev. Biol. 2007. 305: 133-144.